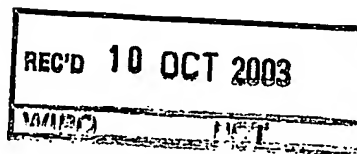


Rec'd PCT/PTO 23 FEB 2005

PCT/JP03/10628 #2

22.08.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 9月20日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-274266  
[ST. 10/C]: [JP2002-274266]

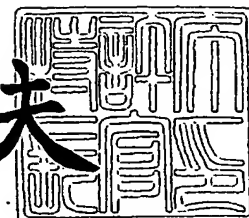
出 願 人  
Applicant(s): 理化学研究所  
株式会社医学生物学研究所

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月26日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A21618A

【提出日】 平成14年 9月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

【氏名】 宮脇 敦史

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区成増1丁目28番12号 財団法人 脳科学・ライフテクノロジー研究所内

【氏名】 安藤 亮子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区徳丸3-10-8スカイプラザ202号室

【氏名】 唐澤 智司

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 390004097

【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【その他】 国等の委託研究の成果に係わる特許出願（産業再生法  
第30条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508 nm (緑) 及び572 nm (赤) であり、蛍光極大波長が518 nm (緑) 及び581 nm (赤) である；

(2) 508 nmにおけるモル吸光係数 (緑) が $98800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ であり、572 nmにおけるモル吸光係数 (赤) が $60400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ である；

(3) 量子収率が0.80 (緑) 及び0.33 (赤) である；及び

(4) 緑色及び赤色のpH感受性についてのpKaは共に5.7である；

【請求項2】 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列；

【請求項3】 以下の何れかのDNA。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA；

(c) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA；又は、

(d) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA；

【請求項4】 請求項3に記載のDNAを有する組み換えベクター。

【請求項5】 請求項3に記載のDNA又は請求項4に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

【請求項6】 請求項1又は2に記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る

融合蛍光蛋白質。

【請求項 7】 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項 6 に記載の融合蛍光蛋白質。

【請求項 8】 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項 6 又は 7 に記載の融合蛍光蛋白質。

【請求項 9】 請求項 6 から 8 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

【請求項 10】 請求項 1 又は 2 に記載の蛍光蛋白質、請求項 3 に記載の DNA、請求項 4 に記載の組み換えベクター、請求項 5 に記載の形質転換体、又は請求項 6 から 8 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来の新規な蛍光蛋白質及びその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

クラゲのエクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

【0003】

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙げられる。YFP は、クラゲ (*Aequorea*) GFP 変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分の YFP の  $\epsilon$  および  $\phi$  は、それぞれ  $60,000 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  およ

び0.6~0.8であり (Tsien, R. Y. (1998). Ann. Rev. Biochem. 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団 (フルオレセインおよびローダミンなど) の値に匹敵する。従ってYFPの絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

#### 【0004】

また、GFP変異体の他の例として、シアン蛍光蛋白質 (CFP) があり、ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) が知られている。また、イソギンチャク (*Discoma* sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、Das Redが知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の4種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、刺胞動物、特にイシサンゴの一種であるヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明者らは鋭意検討し、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来のcDNAライブラリーを用いてから発現クローニングを行った結果、新規な蛍光蛋白質をコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られた蛍光蛋白質の蛍光特性を調べた結果、当該蛍光蛋白質が独特の蛍光特性を有することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

#### 【0007】

即ち、本発明によれば、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質が提供される。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508nm (緑) 及び572nm (赤) であり、蛍光極大波長が518nm (緑) 及び581nm (赤) である;

(2) 508nmにおけるモル吸光係数 (緑) が $98800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ であり、

572 nmにおけるモル吸光係数(赤)が $60400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である;

(3) 量子収率が0.80(緑)及び0.33(赤)である;及び

(4) 緑色及び赤色のpH感受性についての $pK_a$ は共に5.7である;

【0008】

本発明の別の態様によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が提供される。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列;又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列:

【0009】

本発明のさらに別の態様によれば、以下の何れかのDNAが提供される。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA;又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA:

(c) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA;又は、

(d) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び/又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA:

【0010】

本発明のさらに別の態様によれば、本発明のDNAを有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明のDNA又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質が提供される。好ましくは、他の蛋白質は、細胞内に局在する蛋白質である。さらに、好ましくは、他の蛋白質は、細胞内小器官に特異的な蛋白質である。

【0011】

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キットが提供される。

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

##### (1) 本発明の蛍光蛋白質

本発明の蛍光蛋白質は、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508 nm (緑) 及び572 nm (赤) であり、蛍光極大波長が518 nm (緑) 及び581 nm (赤) である；

(2) 508 nmにおけるモル吸光係数 (緑) が $98800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ であり、572 nmにおけるモル吸光係数 (赤) が $60400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ である；

(3) 量子収率が0.80 (緑) 及び0.33 (赤) である；及び

(4) 緑色及び赤色のpH感受性についてのpKaは共に5.7である；

#### 【0013】

ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) は、刺胞動物イソギンチャクの1種で、非常にカラフルな蛍光を示すことを特徴とする。主として、本州中部以南に分布し、内湾の泥底などに生息し、夜間触手を伸ばしてプランクトンなどを捕獲する。色のバリエーションとしては、緑色、褐色又は赤色のものが存在する。

#### 【0014】

本発明の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が508 nm (緑) 及び572 nm (赤) であり、蛍光極大波長は518 nm (緑) 及び581 nm (赤) である。また、508 nmにおけるモル吸光係数 (緑) は $98800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ であり、572 nmに



におけるモル吸光係数（赤）は  $60400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  である。

【0015】

本発明の蛍光蛋白質は、紫外光によって色が変わることを特徴とし、光によって特定の細胞や器官のマーキング（optical marking）が可能である。

【0016】

本発明の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

（a）配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は、

（b）配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列：

【0017】

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

【0018】

本明細書で言う「蛍光を有する」とは、蛍光を発することができる全ての場合を包含し、蛍光強度、励起波長、蛍光波長、pH感受性などの諸特性は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と比較して、変動していてもよい、同様のままでもよい。

【0019】

本発明の蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列並びに配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて上記したような各種の公知の蛍光蛋白質のcD

NAクローンを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを取得することができる。本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

#### 【0020】

##### (2) 本発明のDNA

本発明によれば、本発明の蛍光蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

- (a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA；
- (c) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA；又は、
- (d) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA；

#### 【0021】

本発明のDNAは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって製造することもできる。本発明のDNA又はその断片の作製方法については、本明細書中上述した通りである。

#### 【0022】

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は

、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Mannual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びにCurrent Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

#### 【0023】

##### (3) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

#### 【0024】

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

#### 【0025】

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニク・アミラーゼ遺伝子(Bacillusstearothermophilus maltogenic amylase gene)、バチルス・リケニホルミス $\alpha$ アミラーゼ遺伝子(Bacillus licheniformis alpha-amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BANアミラーゼ遺伝子(Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(Bacillus Subtilis alkaline protease gene)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(Bacillus pumilus xylosidase gene)のプロモータ、またはファージ・ラムダのP<sub>R</sub>若しくはP<sub>L</sub>プロモータ、大腸菌の lac、trp若しくはtacプロモータなどが挙げられる。

#### 【0026】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、またはアデノウイルス2主後期

プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィ・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたはtpiAプロモータなどがある。

#### 【0027】

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTP11ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVARNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

#### 【0028】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカーを含有してもよい。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはシゾサッカロマイセス・ポンベTP1遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は

当業者に周知である。

#### 【0029】

#### (4) 本発明の形質転換体

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

#### 【0030】

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なえばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

#### 【0031】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)またはサッカロマイセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

#### 【0032】

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることによ

り形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

#### 【0033】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)等に記載）。

#### 【0034】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞である Hi Five (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

#### 【0035】

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得

られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0036】

##### (5) 本発明の蛍光蛋白質及びそれを含む融合蛍光蛋白質の利用

本発明は蛍光蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛍光蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列及び配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の蛍光蛋白質の遺伝子を含むDNA断片を鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするDNA断片も入手する。

#### 【0037】

次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛍光蛋白質を産生することができる。

#### 【0038】

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の

蛍光蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲッティング活性を検出することが可能である。

#### 【0039】

本発明の蛍光蛋白質を融合させる他の蛋白質（被検アミノ酸配列）の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲティングシグナル（例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列）等が好適である。なお、本発明の蛍光蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

#### 【0040】

また、本発明の蛍光蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモーター活性の測定に用いることも可能である。即ち、被検プロモーターの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導入し、該細胞から発せられる本発明の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プロモーターの活性を測定することが可能である。被検プロモーターとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

#### 【0041】

上記被検アミノ酸配列のターゲティング活性の検出やプロモーター活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」（P. Southern, and P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327）、「pCAGGS」（H.Niwa,K.Yamamura, and J.Miyazaki. Gene 108,193-200(1991)）、「pRc/CMV」（インビトロゲン社製）、「pCDM8」（インビトロゲン社製）などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」,「pRS304」,「pRS305」,「pRS306」,「pRS313」,「pRS314」,「pRS315」,[pRS316] (R.S.Sikorski and P.Hieter (1989) Genetics 122: 19-27)、「pRS423」,「pRS424」,「pRS425」,「pRS426」 (T.W.Christianson, R.S.Sikorski, M.Dante, J.H.Shero, and P. Hieter



r (1992) Gene 110: 119-122) などが好適に用いられる。

#### 【0042】

また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO(Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK(normal rat kidney)細胞、「*Saccharomyces cerevisiae*」などの酵母細胞や大腸菌 (*E. coli*) 細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

#### 【0043】

上記のようにして得た、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質（蛋白質Xとする）とを融合させた融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Xの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Xの局在や動態を可視化して分析することができる。

#### 【0044】

例えば、蛋白質Xとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキシソームなどの分布や動きを観察できる。

また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

#### 【0045】

本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡（カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット09）や画像解析装置（ATTO デジタルイメージアナライザー）などを用いて行うことが可能である。

顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細

な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。

#### 【0046】

フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。本発明の蛍光蛋白質の場合、励起極大波長が508nm、蛍光極大波長が518である緑色を検出する場合は、励起光490～510nm、蛍光510～530nm程度のフィルターを使用することが好ましい。また、励起極大波長が572nmであり、蛍光極大波長が581nmである赤色を検出する場合は、励起光560～575nm、蛍光575～590nm程度のフィルターを使用することが好ましい。

#### 【0047】

また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却CCDカメラを使用する。冷却CCDカメラは、CCDを冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

#### 【0048】

##### (6) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した蛍光蛋白質、融合蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

蛍光蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【 0 0 4 9 】

## 【実施例】

実施例 1：サンゴからの新規蛍光蛋白遺伝子(Kaede)の単離

色彩に富む蛍光を放つヒュサンゴ *Trachyphyllia geoffroyi* から、蛍光蛋白遺伝子を以下の手順で単離した。

## (1) total RNAの抽出

Acid Guanidium-Phenol-Chloroform法でtotal RNAを抽出した。

凍結したヒュサンゴをMulti-Beads Shocker(安井器械)を用いて変性溶液中で碎き、フェノール/クロロホルムを加え、遠心して蛋白質、DNAとRNAを分離する。RNAを含む水層をisopropanolに加え遠心すると、沈殿としてtotal RNAが得られる。

【 0 0 5 0 】

## (2) RNAの精製

Oligotex-dT30 (Roche社製)を用いて、total RNAからmRNAを分離した。

total RNA にOligotex-dT30<super> を加え、加熱してRNAの2次構造を壊してから、37℃でRNAとOligotex-dTを結合させる。洗浄後、加熱、遠心すると、mRNAが溶出された上清が得られる。Oligotex-dTを取り除いた上、ethanolとNaClでmRNA沈殿させ、水に溶した。

【 0 0 5 1 】

## (3) cDNA の作製

TimeSaverとDirectional Cloning Toolbox (共にAmersham pharmacia社製)を用いてcDNA 断片を作製した。

mRNAを加熱して2次構造を壊した後、First-Strand Reaction MixにDTTとNotI-dT primerと共に加え、first-strandを合成する。更にそれをSecond-Strand Reaction Mixに加え、second-strandを合成し、付属のスパンカラムで精製する。精製したdouble-stranded cDNAの両端にEcoRI adaptor を付け、NotIで3'側のみカットする。もう一度スパンカラムで精製して、cDNA 断片 (EcoRI- NotI) を得た。

【 0 0 5 2 】

#### (4) Expression Cloning

pRSET<sub>B</sub> (Invitrogen社製)にEcoRI、NotIサイトを設け、作製したcDNAを挿入、大腸菌のJM109 DE3株に導入して、LAプレートで培養した。この株では蛋白が合成されるため、UVを照射した時に蛍光を発するコロニーを単離した。

その結果、約13万個から2個の蛍光を持つコロニーを得た。塩基配列をDNAシーケンサーにより決定し、このクローンをKaedeと命名した。Kaedeのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に記載し、塩基配列を配列表の配列番号2に記載する。

#### 【0053】

##### (5) 蛍光特性の解析

##### (a) 蛋白の発現と精製

得られた全長cDNAのN末端にBamHIサイトを、C末端にEcoRIサイトを設け、pRSET<sub>B</sub>(Invitrogen社製)にin frameでサブクローニングして、大腸菌のJM109 DE3株で発現させた。発現蛋白はN末端のHis-tagを利用して、Ni-Agarose gel (QIAGEN社製)を用いて精製した。

#### 【0054】

##### (b) 吸収スペクトルとモル吸光係数、蛍光スペクトルと量子収率

この蛍光蛋白質は、UVを照射することで吸収及び蛍光スペクトルが緑から赤に長波長シフトする。図1は、精製蛋白のUV照射前後の吸収スペクトルを示す(実線が前、点線が後)。モル吸光係数は、蛋白濃度と吸収極大での吸光度より求めた(表1)。

蛍光スペクトルは、UV照射前後を480nmで励起して測定し(図2)、量子収率をFluorescein (Molecular Probes社製)と比較して算出した(表1)。

Kaedeの蛍光特性を以下の表1に示す。

#### 【0055】

【表 1】

Kaede の蛍光特性

励起極大 (nm)	蛍光極大 (nm)	モル吸光係数 ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	量子収 率	PH 感受性 (pKa)	アミノ酸 数
緑：508nm 赤：572nm	緑：518nm 赤：581nm	緑：98,800(508nm) 赤：60,400(572nm)	緑：0.80 赤：0.33	緑：5.7 赤：5.7	225

【0056】

(c) pH 感受性の特性

緑、赤それぞれにつき pH 4～11 のバッファー中での吸収スペクトルを測定した。緑、赤共に pH 9 を境に吸収は徐々に落ちてくる。吸収極大の変化から算出した pKa を上記の表 1 中に示した。

【0057】

実施例 2：哺乳類細胞への新規蛍光蛋白の遺伝子導入

HeLa細胞にLIPOFECTIN Reagent (Gibco社)を用いてKaedeの遺伝子を導入した。図3は、470nmで励起して510nmの蛍光で測定したもので、導入後9時間前後で蛍光が確認できる。哺乳類細胞中でも、UVを照射すると蛍光が長波長にシフトする。

【0058】

【発明の効果】

本発明により、ヒュサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供される。本発明の蛍光蛋白質は、紫外光によって色が緑色から赤色に変わることを特徴とし、光によって特定の細胞や器官をマーキング (optical marking) することが可能である。

【0059】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; RIKEN

&lt;120&gt; Fluorescent proteins

&lt;130&gt; A21618A

&lt;160&gt; 2

【0060】

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 225

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trachyphyllia geoffroyi

&lt;400&gt; 1

Met Ser Leu Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu Leu Met Glu Gly

1

5

10

15

Asn Val Asn Gly His Gln Phe Val Ile Glu Gly Asp Gly Lys Gly His

20

25

30

Pro Phe Glu Gly Lys Gln Ser Met Asp Leu Val Val Lys Glu Gly Ala

35

40

45

Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr Gly

50

55

60

Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Asp His Ile Pro Asp Tyr Phe Lys

65

70

75

80

Gln Ser Phe Pro Lys Gly Phe Ser Trp Glu Arg Ser Leu Met Phe Glu

85

90

95

Asp Gly Gly Val Cys Ile Ala Thr Asn Asp Ile Thr Leu Lys Gly Asp

100

105

110

Thr Phe Phe Asn Lys Val Arg Phe Asp Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn

115

120

125

Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Ala Ser Thr Glu

130

135

140

Lys Met Tyr Leu Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Thr Met Ala

145

150

155

160

Leu Leu Leu Lys Gly Asp Val His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr Thr

165

170

175

Tyr Lys Ser Arg Gln Glu Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe Val  
 180 185 190

Asp His Cys Ile Ser Ile Leu Arg His Asp Lys Asp Tyr Asn Glu Val  
 195 200 205

Lys Leu Tyr Glu His Ala Val Ala His Ser Gly Leu Pro Asp Asn Val  
 210 215 220

Lys

225

【0061】

<210> 2

<211> 678

<212> DNA

<213> *Trachyphyllia geoffroyi*

<400> 2

atg agt ctg att aaa cca gaa atg aag atc aag ctg ctt atg gaa ggc 48

Met Ser Leu Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu Leu Met Glu Gly

1 5 10 15

aat gta aac ggg cac cag ttt gtt att gag gga gat gga aaa ggc cat 96

Asn Val Asn Gly His Gln Phe Val Ile Glu Gly Asp Gly Lys Gly His

20 25 30

cct ttt gag gga aaa cag agt atg gac ctt gta gtc aaa gaa ggc gca 144

Pro Phe Glu Gly Lys Gln Ser Met Asp Leu Val Val Lys Glu Gly Ala

35 40 45

cct ctc cct ttt gcc tac gat atc ttg aca aca gca ttc cat tat ggt 192

Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Ala Phe His Tyr Gly

50 55 60

aac agg gtt ttt gct aaa tac cca gac cat ata cca gac tac ttc aag 240

Asn Arg Val Phe Ala Lys Tyr Pro Asp His Ile Pro Asp Tyr Phe Lys

65 70 75 80

cag tcg ttt ccc aaa ggg ttt tct tgg gag cga agc ctg atg ttc gag	288
Gln Ser Phe Pro Lys Gly Phe Ser Trp Glu Arg Ser Leu Met Phe Glu	
85 90 95	
gac ggg ggc gtt tgc atc gct aca aat gac ata aca ctg aaa gga gac	336
Asp Gly Gly Val Cys Ile Ala Thr Asn Asp Ile Thr Leu Lys Gly Asp	
100 105 110	
act ttt ttt aac aaa gtt cga ttt gat ggc gta aac ttt ccc cca aat	384
Thr Phe Phe Asn Lys Val Arg Phe Asp Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn	
115 120 125	
ggt cct gtt atg cag aag aag act ctg aaa tgg gag gca tcc act gag	432
Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Ala Ser Thr Glu	
130 135 140	
aaa atg tat ttg cgt gat gga gtg ttg acg ggc gat att acc atg gct	480
Lys Met Tyr Leu Arg Asp Gly Val Leu Thr Gly Asp Ile Thr Met Ala	
145 150 155 160	
ctg ctg ctt aaa gga gat gtc cat tac cga tgt gac ttc aga act act	528
Leu Leu Leu Lys Gly Asp Val His Tyr Arg Cys Asp Phe Arg Thr Thr	
165 170 175	
tac aaa tct agg cag gag ggt gtc aag ttg cca gga tat cac ttt gtc	576
Tyr Lys Ser Arg Gln Glu Gly Val Lys Leu Pro Gly Tyr His Phe Val	
180 185 190	
gat cac tgc atc agc ata ttg agg cat gac aaa gac tac aac gag gtt	624
Asp His Cys Ile Ser Ile Leu Arg His Asp Lys Asp Tyr Asn Glu Val	
195 200 205	
aag ctg tat gag cat gct gtt gcc cat tct gga ttg ccg gac aac gtc	672
Lys Leu Tyr Glu His Ala Val Ala His Ser Gly Leu Pro Asp Asn Val	
210 215 220	
aag taa	678
Lys	



225

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明の蛍光蛋白質の吸収スペクトルを示す。

【図 2】

図 2 は、本発明の蛍光蛋白質の蛍光スペクトルを示す。

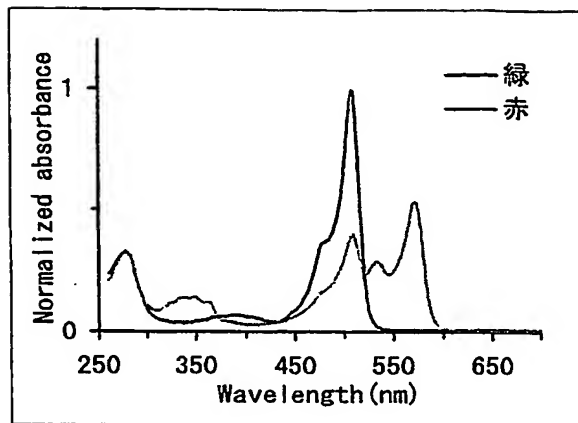
【図 3】

図 3 は、本発明の蛍光蛋白質の遺伝子を導入したHeLa細胞を470nmで励起して、510nmの蛍光で測定した結果を示す。

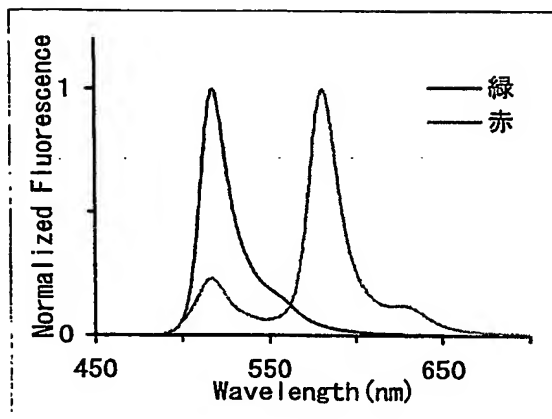
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 刺胞動物、特にイシサンゴの一種であるヒユサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) に由来する新規な一次構造を有する蛍光蛋白質を提供すること。

【解決手段】 ヒユサンゴ (*Trachyphyllia geoffroyi*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

(1) 紫外線の照射により緑色から赤色に変化し、励起極大波長が 508 nm (緑) 及び 572 nm (赤) であり、蛍光極大波長が 518 nm (緑) 及び 581 nm (赤) である；

(2) 508 nm におけるモル吸光係数 (緑) が  $98800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  であり、572 nm におけるモル吸光係数 (赤) が  $60400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  である；

(3) 量子収率が 0.80 (緑) 及び 0.33 (赤) である；及び

(4) 緑色及び赤色の pH 感受性についての  $pK_a$  は共に 5.7 である；

【選択図】 なし

特願 2002-274266

出願人履歴情報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住 所  
氏 名

1990年 8月28日  
新規登録  
埼玉県和光市広沢2番1号  
理化学研究所

特願 2002-274266

出願人履歴情報

識別番号

[390004097]

1. 変更年月日

1998年 7月22日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内  
ビル5F

氏 名

株式会社医学生物学研究所